

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2001-197897  
(P2001-197897A)

(43)公開日 平成13年7月24日(2001.7.24)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード(参考)
C 1 2 P 7/46		C 1 2 P 7/46	4 B 0 6 4
C 0 7 C 51/47		C 0 7 C 51/47	4 H 0 0 6
51/487		51/487	
59/245		59/245	
// (C 1 2 P 7/46		(C 1 2 P 7/46	
審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000-65897(P2000-65897)	(71)出願人	000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成12年3月10日(2000.3.10)	(72)発明者	平岡 宏敏 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱化学株式会社横浜総合研究所内
(31)優先権主張番号	特願平11-317858	(72)発明者	上田 誠 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱化学株式会社横浜総合研究所内
(32)優先日	平成11年11月9日(1999.11.9)	(74)代理人	100103997 弁理士 長谷川 曉司
(33)優先権主張国	日本 (J P)	Fターム(参考)	4B064 AD38 CA02 CE11 DA01 DA11 4H006 AA02 AD17 AD32 BN10 BS10

(54)【発明の名称】 D-リング酸の精製方法

(57)【要約】

【課題】 特に微生物反応によって製造され、菌体由来の脂質やタンパク質に加え、ジカルボン酸類、特にマレイン酸又はL-リング酸を不純物として含有するD-リング酸及び／又はその塩を含有する水性媒体からD-リング酸を高効率に精製する方法を提供する。

【解決手段】 D-リング酸及び／又はその塩を精製するに際し、酸処理した後、活性炭と接触させることを特徴とするD-リング酸の精製方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 D-リンゴ酸及び／又はその塩を精製するに際し、酸処理した後、活性炭と接触させることを特徴とするD-リンゴ酸の精製方法。

【請求項2】 D-リンゴ酸及び／又はその塩が微生物を用いて製造されたものであることを特徴とする請求項1に記載のD-リンゴ酸の精製方法。

【請求項3】 D-リンゴ酸及び／又はその塩が、不純物として有機酸を含有しているものであることを特徴とする請求項1又は2に記載の精製方法。

【請求項4】 有機酸が、ジカルボン酸であることを特徴とする請求項3に記載の精製方法。

【請求項5】 ジカルボン酸がマレイン酸又はL-リンゴ酸であることを特徴とする請求項4に記載の精製方法。

【請求項6】 D-リンゴ酸の塩がカルシウム塩であることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載の精製方法。

【請求項7】 酸処理が、強酸性陽イオン交換樹脂による処理であることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載の精製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、医薬、農薬等の中間体原料として産業上有用な化合物である、D-リンゴ酸の高効率な精製方法に関する。本発明によれば、水溶液中のD-リンゴ酸を簡単に、高純度、高収量で採取することが可能である。

【0002】

【従来の技術】D-リンゴ酸を微生物を用いて製造する方法としては、マレイン酸から製造する方法（特開昭51-70880号公報、特開平5-103680号公報、特許250990号公報）やDL-リンゴ酸からL-体のみをL-アスパラギン酸に変換し、未反応原料のD-リンゴ酸を分離する方法（特開平5-268991号公報、特開平5-271147号公報、特開平6-72945号公報）、DL-リンゴ酸からL-体のみを資化させる方法（Biotech. Let. p. 23-38（1993））等が知られている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記文献において、D-リンゴ酸を単離・精製する工程としては、有機溶媒で抽出した後にクロマト精製を行う方法や過塩素酸を用いた除タンパク工程を有する方法、または、単に陽イオン交換樹脂を用いただけの方法が記載されているのみであった。これらの精製方法のうち、前者は実験室レベルでの精製方法であり、煩雑な方法ため、工業的には使用できず、また、後者は、医薬中間体の原料として用いるに当たっては、精製度合いが未だ不十分であり、更に再結晶工程等が必要であった。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、菌体や培地由来の脂質、有機酸等や各種副生物を含有する反応液から、高効率かつ簡便にD-リンゴ酸を採取するため鋭意検討を行った結果、強酸性陽イオン交換樹脂処理の後に活性炭処理を行うことにより、D-リンゴ酸が高効率で分離・回収できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明の要旨は、D-リンゴ酸及び／又はその塩を精製するに際し、酸処理した後、活性炭と接触させることを特徴とするD-リンゴ酸の精製方法に存する。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明に用いるD-リンゴ酸及び／又はその塩の製造方法は、化学合成法によるものでも微生物や酵素反応を用いたものでも特に限定されるものではないが、微生物を用いて製造されたものが好ましく、具体的には、例えば、安価な無水マレイン酸を原料とし、マレイン酸ヒドラターゼ活性を有する微生物菌体又はその処理物を水性媒体中で作用させて製造したものやDL-リンゴ酸にL-リンゴ酸のみを資化する微生物を作用させたものが挙げられる。

【0007】上記リンゴ酸の塩としては、特に限定されるものではなく、上記反応において系中に共存する金属イオンと塩を形成したものである、上記反応で生成したリンゴ酸塩に無機塩等添加し、更に別の塩に変換したものである。具体的にはナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩等のアルカリ土類金属塩等が挙げられる。

【0008】精製工程に供されるD-リンゴ酸及び／又はその塩の形態としては、固体でも、水性媒体中に溶解した状態でも、一部が析出した懸濁状態でも問題ないが、塩化カルシウム又は硫酸カルシウム等の無機カルシウム塩を、30～55℃、好ましくは45～50℃の範囲で上記製造工程で得られるD-リンゴ酸含有液中に添加し、D-リンゴ酸を不溶性のカルシウム塩とすることが分離・回収を容易にする上では好ましい。

【0009】上記水性媒体としては、上記製造工程で用いられる溶媒、具体的には水、アルコールもしくはその混合物等が挙げられるが、このうち水が好ましい。また、D-リンゴ酸及び／又はその塩は、上記製造工程で系中に共存する菌体由来の脂質、タンパク質や各種有機酸等を不純物として含んでいる。不純物として含まれる有機酸としては、マレイン酸、L-リンゴ酸等の未反応原料やL-リンゴ酸、アスパラギン酸、ピルビン酸、オキサロ酢酸等の反応副生物、菌体由来の各種アミノ酸、脂質等が挙げられ、その多くはジカルボン酸類である。

【0010】本発明は、特に微生物反応によって製造され、菌体由来の脂質やタンパク質に加え、ジカルボン酸

類、特にマレイン酸又はレーリング酸を不純物として含有するDーリング酸及び／又はその塩を精製するのに好ましい方法である。上記Dーリング酸及び／又はその塩の含有する不純物量としては、上記各有機酸量としてそれぞれ10重量%以下が好ましい。

【0011】また精製工程に供される水性媒体中のDーリング酸及び／又はその塩の濃度は、特に制限されるものではないが、通常0.01～20重量%、好ましくは0.1～10重量%である。本発明においては、上記不純物を含有するDーリング酸及び／又はその塩を酸処理した後に活性炭処理することを特徴とする。

【0012】本発明における酸処理としては、酸性溶液や強酸性陽イオン交換樹脂で処理するものが挙げられ、このうち強酸性陽イオン交換樹脂処理が好ましく、また、酸性溶液処理と陽イオン交換樹脂処理を組み合わせても良い。上記酸処理工程に使用する酸性溶液としては、強酸の水溶液であれば限定されないが、このうち硫酸及び／又は塩酸のような無機酸の水溶液が好適に用いられる。

【0013】添加する酸の濃度としては、特に制限されるものではないが、例えば、0.5～5N、好ましくは1N～3Nのものが用いられる。該酸性溶液は、通常、10～50℃にて、Dーリング酸及び／又はその塩を含有する水性溶媒のpHが1～4になるまで添加し、そのまま30分以上、好ましく2時間ほど攪拌する。

【0014】本発明に使用する強酸性陽イオン交換樹脂としては、H型のものまたは他の塩型のものを酸で処理してH型にしたものを用いることができ、例えば「ダイヤイオンSK-1B」H型（三菱化学社製）、「ダウエックス（Dowex）50WX」（Dow Chemical製）、「アンバーライト（Amberlite）IR120, IR122, IR118」（Rohm and Hass製）、「AGMP-50」（Bio-Rad製）、「ダウオライト（Duolite）C-20」（Diamond-Shamrock Chemical製）等が好適に用いられる。

【0015】処理形式としては、Dーリング酸及び／又はその塩の形態にも依存し、Dーリング酸及び／又はその塩が固体又は懸濁状態である場合にはバッチ式が、溶液状態の場合は連続式が好ましい。バッチ式の場合には、Dーリング酸及び／又はその塩に対してプロトン換算で等モル量以上の陽イオン交換樹脂とDーリング酸及び／又はその塩とを、必要に応じて水を加えて、反応器中で所定時間混合する。処理温度としては、10～55℃、好ましくは50℃以下であり、処理時間としては、通常2時間程度である。

【0016】連続式で処理する場合には、陽イオン交換樹脂を充填した塔に、Dーリング酸及び／又はその塩を含む水溶液を通液する方法が挙げられる。処理温度としては、10～55℃、好ましくは50℃以下であり、通

液条件としては、空間速度（ml/ml樹脂・hr）

0.5～5、好ましくは1～3である。又、上記連続処理方式では、流動床型処理装置も好適に使用される。

【0017】上記処理工程を経たDーリング酸含有液体は、活性炭と接触させる。本発明の活性炭処理工程において使用する活性炭としては、特に限定されるものではなく、通常、比表面積が500～3000m<sup>2</sup>/gであるものが使用される。この活性炭としては、例えば、「特製白鷺」、「粒状白鷺DC」、「カルボラフィン」、「白鷺A」、「白鷺M」（以上武田薬品工業社製）、「ダイアホープS60」、「ダイアホープS61」、「ダイアホープS70」、「ダイアホープS80」（以上三菱化学社製）として市販されている市販品を好適に用いることができ、このうちリング酸の損失量が少ないという点では、白鷺Aまたは白鷺Mが好ましい。

【0018】活性炭処理の形式としては、Dーリング酸含有液体に活性炭をそのまま添加し接触処理後、これを分離するバッチ式でも、活性炭の充填塔にDーリング酸含有液体を連続的通液する連続式でも特に限定されることは無い。活性炭の使用量としては、上記液体に対して0.01～1%W/Vであり、好ましくは0.05～0.5%W/Vである。処理は、通常55℃以下、好ましくは、30～50℃で行われ、バッチ式の場合には、通常1～2時間攪拌すればよい。

【0019】さらに、本精製工程には、必要に応じて、陰イオン交換樹脂処理工程、限外濾過工程等を入れることもでき、これらは、上記精製工程の前後だけでなく、陽イオン交換樹脂処理工程と活性炭処理工程との間に組み込むことも可能である。本発明の精製処理を行った後、該処理液を蒸発乾固させることでDーリング酸粉末を得ることが出来る。

【0020】

【実施例】以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。尚、Dーリング酸量の測定は、高速液体クロマトグラフィー（Shodex Sugar SH1821）を用いて行った。また、Dーリング酸の光学純度は高速液体クロマトグラフィー（SUMICHIRAL OA-5000）により確認した。高速液体クロマトグラフィーの分析条件は次のとおりである。

高速液体クロマトグラフィー分析条件（定量分析用）

カラム：Shodex SUGAR SH1821

8.0mm I.D. x 300mm（昭和電工（株））

溶離液：0.01N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

流速：0.6mL/分間

カラム温度：室温

検出器：RI

高速液体クロマトグラフィー分析条件（光学純度測定用）

カラム: SUMICHIRAL OA-5000  
4.6mm I.D. x150mm (株)住化分析センター)

溶離液: 1mM酢酸銅

0.1M酢酸アンモニウム

in 水/イソプロピルアルコール(85:15) pH4.5

流速: 0.9mL/分間

カラム温度: 35℃

検出器: UV 280nm

また、D-リング酸中の蛋白量は、Bio Rad社製蛋白質定量キットを用いて行い、カルシウム量は、和光純薬社製カルシウムC-テストワコーを用いて行った。

【0021】参考例1 マレイン酸ヒドラターゼ含有菌体の調製

培地〔ソルビトール 10.0g、マレイン酸3.0g、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2.0g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10.0mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim6\text{H}_2\text{O}$  10.0mg、酵母エキス 5.0g、L-プロリン 2.0g、/蒸留水1000mL pH7.0〕100mLを500mL容三角フラスコに分注し、滅菌した後、アルスロバクター・エスピー (*Art hrobacter sp*) MCI2612株 (FERM P-12562) を植菌し、30℃にて20時間震盪培養した。

【0022】次に、上記と同じ組成の培地 2リットルを5リットル容通気攪拌槽に仕込み、滅菌(120℃、20分間)後、前記培養物の20mLを添加して、回転数450rpm、通気量1vvm、温度30℃、pH7.0にて16時間培養した。培養終了後、培養物のうち、2リットルを分取し、遠心分離により集菌した。参考例2 D-リング酸含有反応液の調整上記参考例1で得た集菌体を(A)反応液〔(A):無水マレイン酸33.8g、リン酸一カリウム1.02g、リン酸二カリウム2.18g、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエステル2g/脱イオン水1リットル(NaOHでpHを7.0に調整)〕1リットルに懸濁し、37℃にて震盪反応させた。反応開始4時間後に(B)反応液

〔(B):無水マレイン酸135.2g、リン酸一カリウム1.02g、リン酸二カリウム2.18g、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル2g/脱イオン水1リットル(NaOHでpHを7.0に調整)〕125ミリリットル添加し、引き続き40時間、トータルで44時間震盪反応させた。

【0023】反応終了後、遠心分離(8000xg、30分間、10℃)にて上澄液と菌体を分離した。

実施例1

参考例2により調製した反応上澄液100mL(マレイ

ン酸5.3mg/mL、D-リング酸58.3mg/mL含有)を50℃まで加熱攪拌した後、反応液温度を50℃に保ちながら塩化カルシウム9.69gを攪拌しながら添加し、引き続き2時間攪拌した。その後引き続き2時間放冷して室温まで冷却し、生成したカルシウム塩を含む沈殿を遠心分離(8000xg、5分間)することで溶液画分より分離し、含水結晶を得た。この含水結晶を強酸性陽イオン交換樹脂(三菱化学(株)社製商品名「ダイヤイオンSK-1B」H型)100mLで回分処理し、次いで該処理液を遠心分離(8000xg、20分間)後、活性炭回分処理(0.1重量%白鷺M;50℃、1時間)にて菌体由来の夾雑成分等を除去した後、真空エバポレーターにより濃縮した。回収したD-リング酸の量は2560mgであり、収率は43.9%であった。又、該結晶の光学純度を測定したところ、100%eeであった。また、上記D-リング酸は、不純物である蛋白に関しては測定限界以下(1.25um/mL以下)、カルシウムイオン濃度に関しては0mg/dl(コントロール以下)であった。

【0024】実施例2

参考例2により調製した反応上澄液100mLから実施例1と同様にして含水結晶を得た。この含水結晶に蒸留水10mL添加後2N硫酸を37mL添加して2時間攪拌した。遠心分離(8000xg、10分間)により沈殿を除去後当該上清を強酸性陽イオン交換樹脂(三菱化学(株)社製商品名「ダイヤイオンSK-1B」H型)100mLを充填したカラムに、空間速度2.0で通液した後、活性炭回分処理(0.1重量%白鷺M;50℃、1時間)に供し、さらに真空エバポレーターにより濃縮した。回収したD-リング酸の量は2600mgであり、収率は44.6%であった。又、該結晶の光学純度を測定したところ、100%eeであった。また、上記D-リング酸は、不純物である蛋白に関しては測定限界以下(1.25um/mL以下)、カルシウムイオン濃度に関しては0mg/dl(コントロール以下)というような高純度のものではなかった。

【0025】実施例3

参考例2により調製した反応上澄液100mL(マレイン酸5.3mg/mL、D-リング酸58.3mg/mL含有)を強酸性陽イオン交換樹脂(三菱化学(株)社製商品名「ダイヤイオンSK-1B」H型)100mLを充填したカラムに、空間速度2.0で通液した後、活性炭回分処理(0.1重量%白鷺M;50℃、1時間)に供した後、該処理液を真空エバポレーターにより濃縮した。回収したD-リング酸の量は4700mgであり、収率は82.3%であった。又、該結晶の光学純度を測定したところ、100%eeであった。上記D-リング酸は、不純物である蛋白に関しては測定限界以下(1.25um/mL以下)、カルシウムイオン濃度に関しては0mg/dl(コントロール以下)というような高純度のものではなかった。



あった。

#### 【0026】実施例4

培地 (DL-リンゴ酸 10.0g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、／蒸留水 1000mL pH7.2) 100mlを500ml容三角フラスコに分注し、滅菌した後、アシネトバクター・ルウオフィ (*Acinetobacter lwoffii*) ATCC 9036を植菌し、30℃にて4日間振盪培養した。

【0027】培養終了後、培養物800mLから遠心分離 (8000g、10分間、10℃) にて上澄液と菌体を分離した。この上澄み液800ml (リンゴ酸5.2mg/ml含有) を真空エバポレーターにより濃縮し、D-リンゴ酸を含む濃縮上澄み液 (リンゴ酸79.8mg/ml含有) を得た。該濃縮上澄み液20mLを50℃まで加熱攪拌した後、液温度を50℃に保ちながら塩化カルシウム2.6gを攪拌しながら添加し、引き続き2時間攪拌した。その後引き続き2時間放冷して室温まで冷却し、生成したカルシウム塩を含む沈殿を遠心 (8000g 5分間) することで溶液画分より分離し、含水結晶を得た。この含水結晶に脱塩水10mLを添加しスラリーとした後、濃硫酸0.64mLを滴下して1時間30℃にて攪拌した後沈殿を遠心 (8000g 10分間) することで固体画分を分離し、溶液画分を得た。この溶液画分を強酸性陽イオン交換樹脂 (三菱化学 (株) 社製商品名「ダイヤイオンSK-1B」H型) 10mlでバッチ処理し、該処理液を遠心 (8000g 20分間)、活性炭処理 (0.1%w/v白鷺M; 50℃ 1時間) した後、真空エバポレーターにより濃縮した。回収したD-リンゴ酸の結晶量は523mgであり、反応液からの収率は32.8%であった。さらに該結晶の光学純度を測定したところ、99.5%eeであった。上記D-リンゴ酸は、蛋白に関しては測定限界以下 (1.25u m/mL以下)、カルシウムイオン濃度に関しては0mg/dl

(コントロール以下) というような高純度のものではなかった。

#### 【0028】実施例5

培地 (DL-リンゴ酸 10.0g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、／蒸留水 1000mL pH7.2) 100mlを500ml容三角フラスコに分注し、滅菌した後、アシネトバクター・ルウオフィ (*Acinetobacter lwoffii*) ATCC 9036を植菌し、30℃にて3日間振盪培養した。

【0029】培養終了後、培養物500mLから遠心分離 (8000g、10分間、10℃) にて上澄液と菌体を分離し、D-リンゴ酸を含む上澄み液を得た。該上澄み液100ml (リンゴ酸5.1mg/ml含有) を強酸性陽イオン交換樹脂 (三菱化学 (株) 社製商品名「ダイヤイオンSK-1B」H型) 30mlで2時間バッチ処理し、該処理液を遠心 (8000g 20分間) 後、活性炭処理 (0.1%w/v白鷺M; 50℃ 1時間) にて夾雑物除去した後、真空エバポレーターにより濃縮した。回収したD-リンゴ酸の結晶量は424mgであり、培養液からの収率は83%であった。さらに該結晶の光学純度を測定したところ、99.6%eeであった。

【0030】上記D-リンゴ酸は、蛋白に関しては測定限界以下 (1.25u m/mL以下)、カルシウムイオン濃度に関しては0mg/dl (コントロール以下) というような高純度のものではなかった。

#### 【0031】

【発明の効果】本発明によれば、特に微生物反応によって製造され、菌体由来の脂質やタンパク質に加え、ジカルボン酸類、特にマレイン酸又はL-リンゴ酸を不純物として含有するD-リンゴ酸及び／又はその塩を含有する水性媒体から、簡便に、高純度、高収量でD-リンゴ酸を精製することができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
C12R 1:06)

識別記号

FI  
C12R 1:06)

テコード (参考)

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-197897

(43)Date of publication of application : 24.07.2001

(51)Int.Cl.

C12P 7/46  
C07C 51/47  
C07C 51/487  
C07C 59/245  
//(C12P 7/46  
C12R 1:06 )

(21)Application number : 2000-065897

(71)Applicant : MITSUBISHI CHEMICALS CORP

(22)Date of filing : 10.03.2000

(72)Inventor : HIRAOKA HIROTOSHI

UEDA MAKOTO

(30)Priority

Priority number : 11317858 Priority date : 09.11.1999 Priority country : JP

(54) METHOD FOR PURIFYING D-MALIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for highly effectively purifying D-malic acid from an aqueous medium containing D-malic acid and/or its salts produced by a microorganism reaction and containing dicarboxylic acids, especially maleic acid or L-malic acid, besides lipids or proteins derived from a microbial cell as an impurity.

SOLUTION: The method for purifying D-malic acid comprises contacting the aqueous medium with an active carbon after acid treating in the purification of D-malic acid and/or its salts.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

15.07.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office